Núm. 65 1.° de octubre de 1954

# BOLETIN

DEL

# INSTITUTO ESPAÑOL DE OCEANOGRAFIA

## Determinación colorimétrica de la alteración del pescado

por

A FERNANDEZ DEL RIEGO

y

A. RODRIGUEZ DE LAS HERAS

JUN 1955

INSTITUTO ESPAÑOL DE OCEANOGRAFIA

MINISTERIO DE MARINA

MADRID

## ULTIMOS NUMEROS PUBLICADOS

27.—Josefa SANZ-ECHEVERRÍA: «Notas sobre otolitos de peces procedentes de las costas del Sáhara. Segunda parte».

28.—Guillermo COLOM: «Exploración oceanográfica del Africa Occidental. Estudio de los Foraminíferos de muestras de fondo recogidas entre los Cabos Juby y Bojador».

29.—Joaquín GÓMEZ DE LLARENA: «Exploración oceanográfica del Africa Occidental. Observaciones sobre los sedimentos recogidos entre los Cabos Juby y Bojador».

30.—Luis BELLÓN: «Pesca y utilización del Boquerón y de la Sardina en las costas de Málaga».

31.—José M.ª NAVAZ: «Contribución al estudio de los Escómbridos de la costa vasca (atún, bonito y melva)».

32.—José M.ª NAVAZ y Francisco de P. NAVARRO: «Nuevos datos sobre la sardina y la anchoa de la costa vasca»

33.—R. FERNÁNDEZ y F. de P. NAVARRO: «Observaciones sobre la sardina de Santander (octubre de 1948 a octubre de 1949)».

34.—Emma BARDÁN y F. de P. NAVARRO: «Nuevos datos sobre la sardina de Málaga»

35.—Miguel MASSUTÍ, Teresa VALLS y F. de P. NAVARRO: «Nuevas observaciones sobre la sardina y la alacha de Baleares».

36.—Fernando LOZANO: «Notas sobre el Bonito del Norte o Albacora [*Germo alalunga* (Gml.)] de Galicia».

37.—Miguel MASSUTÍ y Francisco de P. NAVARRO: «Tintínidos y Copépodos planctónicos del Mar de Alborán (Campaña del «Xauen» en agosto y septiembre de 1948)». (Con una breve necrología del Dr. Massutí.)

38.—Campaña del MALASPINA en enero de 1950 en aguas del Sáhara, desde Punta Durnford a Cabo Barbas.—Registro de operaciones.

39.—M.ª Dolores GARCÍA PINEDA: «Efectos del lavado previo en la extracción de componentes útiles de las algas pardas».

40.—M.ª Jesús DEL VAL y Dominica MONTEQUI: «Sobre el aislamiento de los componentes glucídicos de las algas pardas».

41.—Buenaventura ANDREU: «Consideraciones sobre el comportamiento del ovario de sardina (*Sardina pilchardus* Walb.) en relación con el proceso de maduración y de freza».

42.—Miguel OLIVER: «La sardina de la costa noroeste española en 1948 y 1949 (Estudio biométrico y biológico)».

43.—Rafael LÓPEZ COSTA: «Sobre la determinación del nitrógeno nítrico en el agua de mar. I. La resorcina como reactivo de los nitratos».

44.—A. FERNÁNDEZ DEL RIEGO: «Determinación del carbónico de los fondos de la Ría de Vigo. Cálculo del carbonato disuelto y consecuencias geobiológicas».

*(Sigue en tercera página de la cubierta.)*

# DETERMINACION COLORIMETRICA DE LA ALTERACION DEL PESCADO

**Número 65.** **1.º de octubre de 1954**

Boletín del Instituto Español de Oceanografía

Núm. 65 1.° de octubre de 1954

# DETERMINACION COLORIMETRICA DE LA ALTERACION DEL PESCADO

por

A. FERNANDEZ DEL RIEGO

y

A. RODRIGUEZ DE LAS HERAS

La medida de la alteración del pescado por procedimientos químicos ha sido objeto de numerosas investigaciones. En nuestro país, hace relativamente poco tiempo, el Doctor Montequi, Jefe del Departamento de Química Aplicada del Instituto Español de Oceanografía, publicó una puesta al día de la cuestión (1) que había de servir de base a estudios experimentales y que nos indujo a trabajar para el logro de un método rápido, sencillo, económico, objetivo y, sobre todo, representativo del estado de frescura del pescado.

La revisión cronológica y crítica que el Profesor Montequi realiza en el citado trabajo nos ha facilitado notablemente la labor al no tener que ensayar métodos juzgados como poco representativos, ni aquéllos que utilizan técnicas lentas o complicadas. Así, hemos prescindido de las técnicas de Boury (2) por requerir aparatos demasiado complicados y excesivo tiempo para la obtención de la pulpa, filtración y operaciones subsiguientes, además de ser precisa una destilación a vacío y valoración ulterior. Pero queremos hacer mención de la reciente y documentada publicación de Lionel Farbe (3) en la que da cuenta de la labor realizada con sus colaboradores durante quince años con el fin de hallar un método práctico para determinar el estado de alteración del pescado, principalmente del atún, y la manera de evitarla. Dichos investigadores hacen una revisión y comprobación de las pruebas utilizadas en la bibliografía por ellos consul-

tada, determinando nitrógeno volátil total, mono—, di— y trimetilamina, indol, ácido sulfhídrico, ácidos volátiles, acidez del aceite, sustancias reductoras arrastrables por el vapor y sustancias oxidables en filtrados libres de proteinas procedentes de extractos acuosos de pescado, carne y grasa. Acompañan tablas comprensivas de valores en compuestos nitrogenados volátiles, trimetilamina, indol, sulfhídrico, amoníaco, compuestos carbonílicos, ácidos volátiles arrastrables por el vapor, deteniéndose en el estudio de esta última determinación para, finalmente, prescindir de la determinación de las sustancias citadas como indicadoras del estado de alteración en las especies objeto de su estudio, todas ellas grasas, y establecer un método original, que abreviadamente llaman de «V. R. S.». En este método, el índice de alteración viene expresado por el número de microequivalentes de permanganato potásico consumido por las sustancias volátiles reductoras de la muestra, dato que consideran como el más concordante con el criterio organoléptico.

Nosotros, después de conocer el estudio experimental comparativo de la variación de diversas sustancias producidas durante la alteración del pescado—amoníaco, óxido de trimetilamina, dimetilamina, contenido bacteriano y trimetilamina—y del examen de las curvas de variación correspondientes que Reay (4) realiza con ejemplares de *haddock*, hemos colegido, de acuerdo con su criterio, que también sustenta Dyer (5), que la prueba de la trimetilamina supone la más fiel expresión de la evolución alternativa del pescado fresco.

Sostiene en síntesis Dyer en su interesante trabajo que la trimetilamina producida en el curso de la alteración puede ser objeto de una sencilla determinación colorimétrica. Nosotros hemos llevado a cabo un estudio experimental para confirmar las afirmaciones de Dyer, comparar su método de valoración con alguno de los otros conocidos, y estimado como valioso, y apreciar las ventajas que el nuevo procedimiento pudiera ofrecer. Este programa ha sido llevado a la práctica y el resultado de nuestros trabajos se incluye en esta publicación. Como podrá apreciar el lector, hemos introducido modificaciones a la técnica de Dyer que, en nuestra opinión, ofrecen evidentes ventajas.

El método de Dyer para la determinación de la trimetilamina en el pescado se basa en la extracción del nitrógeno trimetilamínico contenido en cantidades de 0,002 mg. a 0,02 mg. en una muestra de carne de pescado alcalinizada y adición de disolución clorofórmica de

ácido pícrico para formar el picrato de trimetilamina, de color amarillo, susceptible de comparación colorimétrica. Dyer empleó satisfactoriamente su método en más de ocho mil determinaciones de trimetilamina en extractos de pescado con ácido tricloroacético y formaldehido, y directamente en la salsa de pescado en conserva.

Hemos tenido que apartarnos de la técnica de Dyer ante nuestro propósito de lograr un método basado principalmente en la sencillez y economía, que pueda ser utilizado en laboratorios y fábricas sin necesidad de disponer de costosos aparatos. Como disolvente del ácido pícrico hemos utilizado el tricloroetileno en vez del cloroformo, habiendo aumentado unas quince veces la concentración en trimetilamina, y variado también las concentraciones de ácido tricloroacético, formol y carbonato potásico, con la gran ventaja de poder efectuar la medida del color de la solución de picrato de trimetilamina con mayor discriminación comparativa. En efecto, la diferencia de color entre dos tipos contiguos o separados la misma distancia es suficiente para su comparación, mediante una escala de tubos patrón, con cantidades conocidas que varían gradualmente de un tubo a otro, dentro de los límites de las cantidades en trimetilamina del peso de carne de pescado, fresco o podrido, que utilizamos en nuestra técnica. Esto permite a los laboratorios que no disponen de fotocolorimétrico bastarse a sí mismos en lo que se refiere al control del estado de frescura del pescado.

## REACTIVOS NECESARIOS

*Tolueno* químicamente puro, secado por agitación con sulfato sódico anhidro. Las sustancias que interfieren pueden ser eliminadas por agitación con ácido sulfúrico normal, destilación y secado con sulfato sódico.

Solución de *ácido pícrico* puro y seco al 0,1 por 100 en *tricloroetileno* libre de humedad.

Solución de *carbonato potásico* químicamente puro en agua destilada a partes iguales.

*Formaldehido*. Solución de formalina comercial al 40 por 100, agitada con carbonato magnésico y filtrada.

*Acido tricloroacético* químicamente puro.

*Sulfato sódico* puro recién calcinado.

Solución madre de *trimetilamina* preparada como se detalla a continuación :

## OBTENCION DE LA SOLUCION DE TRIMETILAMINA

Nos hemos servido de las indicaciones de Giral y Rojhan (6) recogiendo la trimetilamina formada en tolueno, más apropiado para nuestros fines que el benceno que ellos prescriben.

En un matraz de 1.000 centímetros cúbicos con refrigerente de reflujo se mezclan 100 gramos de cloruro amónico con 265 gramos de trioximetileno. El refrigerante ha de ser largo, ancho y en pico de flauta para evitar pérdidas y taponamientos por sublimación del formaldehido. El matraz se va calentando lentamente en baño de aceite ; entre 80° y 100° C la masa se funde y calentando más empieza a producirse una viva reacción con desprendimiento de gas carbónico. Hay que regular el calentamiento para que la reacción no sea demasiado violenta. En todo caso, la temperatura no debe pasar de 130°. Una vez que haya cesado el desprendimiento de gas (dos o tres horas) se puede calentar despacio hasta 160°, durante unas dos horas más, para completar la reacción. Al cabo de este tiempo y ya fría la masa, se cambia el refrigerante, poniéndole en posición descendente para deslizar, y se adapta un embudo de llave en la boca del matraz. El extremo del refrigerante se conecta con un frasco vacío, éste con una torre desecadora llena con cal sodada y, finalmente, dos frascos de absorción con 350 y 100 c. c. de tolueno seco, respectivamente. Los tubos de entrada a ambos frascos se introducen como 1,5 a 2 centímetros por debajo de la superficie del tolueno. Los dos frascos se enfrían bien, rodeándolos con hielo y sal. Todas las conexiones deben ser perfectas para evitar pérdidas.

En el embudo de llave se coloca una disolución de 100 gramos de sosa cáustica en 200 c. c. de agua, que se va añadiendo lentamente para obtener un desprendimiento regular de trimetilamina. Por la velocidad de caída de la sosa y, en caso necesario, calentando el matraz suavemente a baño maría, se obtiene un desprendimiento suave. Terminada la adición, se calienta el matraz durante 15-20 minutos para desalojar los últimos restos de trimetilamina. Los frascos de absorción con tolueno deben agitarse suavemente de vez en cuando. Reunidas las dos disoluciones toluénicas se miden y titulan para saber su contenido.

## OBTENCIÓN DEL PARAFORMALDEHIDO (TRIOXIMETILENO)

El paraformaldehido necesario para la práctica anterior lo hemos preparado según normas de los citados autores: En un vaso de vidrio fino se mezclan con mucho cuidado 60 gramos de solución de formaldehido al 40 por 100 con 30 c. c. de ácido sulfúrico concentrado y se deja estar toda la noche. El paraformaldehido que se separa se enjuaga después de diluir la muestra con agua y se lava hasta que el filtrado no dé más que ligero enturbiamiento con cloruro bárico. Se seca sobre plato poroso.

## PREPARACIÓN DE LOS TIPOS DE COMPARACIÓN

Después de asegurarnos de la ausencia de amoníaco en la solución toluénica de trimetilamina la valoramos con ácido clorhídrico normal, resultando con un contenido de 11,1 gramos por 100 de trimetilamina. De esta solución (que llamaremos A) tomamos un centímetro cúbico y lo diluímos con tolueno hasta 100 c. c. (disolución B). A partir de ésta preparamos una tercera, tomando 27 centímetros cúbicos y diluyendo a 100 c. c. (disolución C), con un contenido, por tanto, esta última, de 30 mgs. de trimetilamina por 100 c. c. de disolución toluénica.

A partir de esta disolución hemos preparado 10 tipos conteniendo 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, y 30 mgs. por 100 de trimetilamina, para lo cual hemos tomado 0,5, 1, 1,5... hasta 5 c. c. de solución C y diluyendo con toluol hasta alcanzar el volumen de 5 c. c., excepto en el tipo que contenía 30 mgs. de trimetilamina por 100 en que, claro es, se midieron justamente 5 c. c. de solución C.

A cada uno de éstos volúmenes contenidos en tubos de ensayo, se adicionaron 5 c. c. de una solución al 0,1 por 100 de ácido pícrico en tricloroetileno, cerrando los tubos con tapones parafinados. Los colores perduran durante varias horas sin variaciones sensibles, no obstante lo cual, procedimos por comparación a preparar tipos de color más permanente. Para ello hemos utilizado una disolución acuosa de ácido pícrico, diluída convenientemente hasta ajustar su color con el de los diferentes tipos toluénicos. Así, hemos obtenido 10 tipos de solución acuosa de ácido pícrico de intensidad y tonalidad idénticos a los de los tipos toluénicos, comparando uno por uno y diluyen-

do hasta la igualdad de color. La observación se hizo de espaldas a la luz, sobre fondo blanco donde se apoyaban los tubos yuxtapuestos, lográndose la comparación con comodidad y justeza, ya que la diferencia de intensidad de color entre dos tipos contiguos es francamente acusada.

Una vez cerrados los tipos se tapan y parafinan.

## TECNICA SEGUIDA EN LA DETERMINACIÓN

Se toman 10 gramos de carne de todo el cuerpo del pescado sin incluir porción intestinal alguna y se trituran bien en mortero de vidrio ; se adicionan 10 c. c. de la solución de ácido tricloracético al 20 por 100 y se prosigue la mezcla por trituración hasta papilla homogénea. Se deja un momento reposar la masa y se toman por decantación 5 c. c. del extracto, al que se añaden 1,5 c. c. de formol al 38 por 100, 10 c. c. de toluol y 15 c. c. de disolución saturada de carbonato potásico, agitando completamente después de cada adición, sobre todo después de la adición de la disolución alcalina, para lograr una mezcla emulsionada. Se deja reposar para que se rompa la emulsión y de la capa toluénica limpia que sobrenada se toman 5 c. c. con una pipeta seca y se vierten en un tubo de ensayo seco, en el que previamente se ha introducido con la punta de una espátula un poquito de sulfato sódico en polvo recién calcinado y enfriado, y se vierte el líquido—así privado de trazas de agua—sobre 5 c. c. de solución de ácido pícrico al 0,1 por 100 contenidos en un tubo de ensayo seco y se compara.

## RESULTADOS EXPERIMENTALES

Con arreglo a la mencionada técnica hemos efectuado ensayos en lotes de pescadillas *Merlucius merlucius,* fanecas *Gadus luscus* y panchos *Pagellus erythrinus* tanto con ejemplares dejados al aire como conservados en hielo. Así, de un lote recién desembarcado en la Lonja, uno de los ejemplares fué analizado una hora y media después, acusando un contenido entre 6 y 9 mgs. de trimetilamina por 100 correspondientes al color comprendido entre los tipos 2 y 3 de nuestra escala. Los restantes ejemplares fueron conservados en hielo y analizados en días sucesivos. A las veinticuatro horas uno de los ejem-

plares acusó 10 mgs. de trimetilamina por 100 (color comprendido entre los tipos 3 y 4), siendo de completa frescura el aspecto del pescado. A las cuarenta y ocho horas se ha sacado del hielo otro ejemplar, que presentaba ya la carne más blanda, sobre todo en la parte ventral, pero todavía en buenas condiciones de ingestibilidad, acusando 18 mgs. de trimetilamina por 100. A las setenta y dos horas el pescado conservado en hielo estaba aun más blando pero siendo todavía ingestible, habiendo acusado un contenido de 30 mgs. de trimetilamina por 100.

Como quiera que los contenidos en trimetilamina de algunas muestras analizadas, correspondiendo algunas a pescados todavía frescos, eran superiores a los de nuestra escala de tipos, nos vimos precisados a ampliar la escala hasta un contenido de 60 mgs. de trimetilamina por 100 c. c. de disolución.

Se ha trazado la curva de variación de trimetilamina-tiempo, expresando aquélla en miligramos de nitrógeno trimetilamínico por 100 gramos de carne de pescado (Figura 1), pudiendo observarse que la pendiente es suave en los primeros estados de la alteración, haciéndose más pronunciada según avanza la descomposición, alcanzando valores elevados para el coeficiente angular cuando el pescado entra en franca putrefacción, hacia los 15 mgs. de nitrógeno trimetilamínico por 100 gramos de carne. En ninguno de los casos estudiados con las especies mencionadas—pescadilla, faneca y pancho—conservadas al aire o en hielo, se han obtenido valores en trimetilamina iguales o inferiores para tiempos posteriores, sino que se obtiene un incremento continuo en las cifras de trimetilamina a medida que con el transcurso del tiempo la descomposición avanza. Al comienzo de la alteración crece lentamente la cantidad de trimetilamina, para aumentar con rapidez cuando el pescado comienza a ablandarse y alcanzar valores muy elevados una vez iniciada la putrefacción. Nuestros resultados están de acuerdo con los de Dyer (5) y Reay (4) que establecen un aumento creciente de esa base con el tiempo, y en contra de las oscilaciones, aunque con manifiesta tendencia al crecimiento, halladas por Lionel Farbe (3) para pescado graso como el atún, en lotes conservados a cinco temperaturas distintas y realizando las observaciones con intervalos de pocas horas. Este autor dice haber encontrado resultados análogos para la sardina de California y la caballa del Pacífico: es decir, para pescados grasos, y nuestros ensayos están referidos a pescados magros.

En cuanto al límite de trimetilamina en el pescado para conside-

rarlo todavía ingestible, hemos de decir que aquél depende algo del procedimiento utilizado para conservar el pescado. Así, por ejemplo, en el caso de fanecas, hemos observado mediante pruebas degustati-

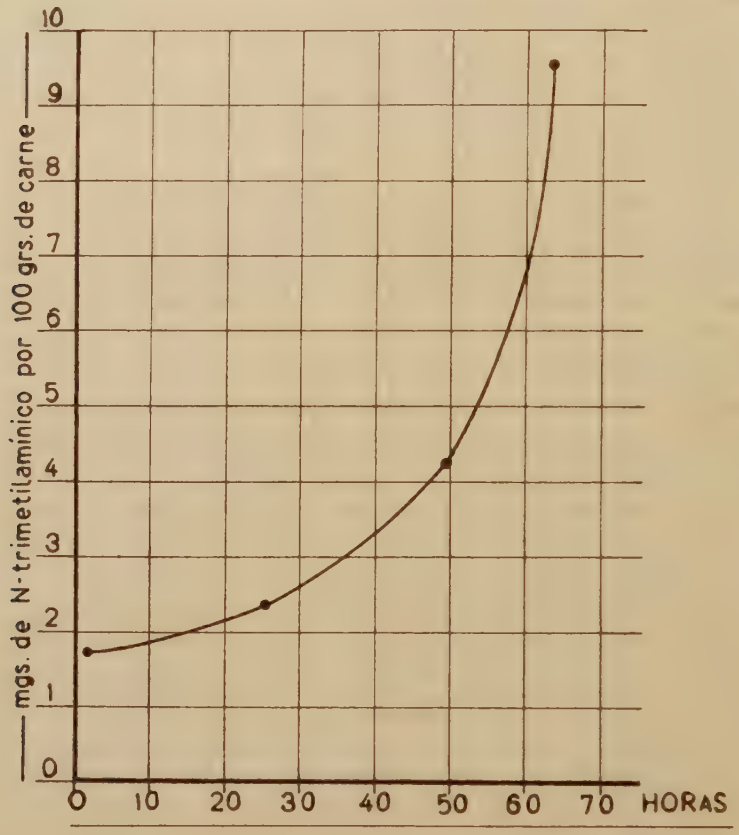


Fig. 1.—Marcha del contenido trimetilamínico en fanecas conservadas en hielo, después de hora y media de su captura.

vas, que conservadas en hielo eran aceptables con un contenido de 15 miligramos de nitrógeno trimetilamínico por 100 y en cambio, conservadas al aire el límite era de 13 mgs. Las diferencias halladas en los resultados de la técnica colorimétrica de determinación de trimetilamina para las tres especies objeto de este estudio, son despreciables, habiendo mostrado valores iguales de trimetilamina calidades análogas de pescado, por lo que puede considerarse la determinación colorimétrica de esta base como un método práctico para esta-

blecer el grado de frescura del pescado, pudiendo establecer que el pescado es de primera calidad con un contenido hasta de 8 mgs. de nitrógeno trimetilamínico por 100 grs. de carne, y de segunda calidad, con un contenido hasta de 12 ó 13 mgs., debiendo ser rechazados como alimento los pescados con un contenido trimetilamínico superior a 13 mgs. por 100. (Véase figura 4.)

## COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS CON LA TECNICA COLORIMETRICA Y EL METODO DE CONWAY

Para asegurarnos más de la bondad del procedimiento colorimétrico descrito anteriormente, hemos comparado, operando de la manera que describimos más adelante, nuestra técnica con la conocida de Conway (7) basada en un micrométodo que Beatty y Gibbons aplican a la determinación de trimetilamina en jugo de pescado, con los valores siguientes para uno y otro método operatorio :

*Cantidad en miligramos de nitrógeno trimetilamínico por 100 gramos de carne de pescado.*

| | Método colorimétrico. | Método de Conway | Diferencia |
|---|---|---|---|
| «Gadus luscus» (Faneca) | 0,400 | 0,380 | 0,020 |
| | 1,440 | 1,650 | —0,250 |
| | 0,943 | 1,000 | 0,057 |
| | 2,850 | 3,100 | 0,150 |
| | 3,330 | 2,710 | —0,620 |
| | 6,190 | 6,050 | —0,620 |
| | 14,200 | 12,800 | 1,400 |
| | 42,800 | 40,000 | 2,800 |
| «Merlucius merlucius» (Pescadilla) | 3,570 | 3,760 | —0,190 |
| | 9,000 | 6,710 | 2,290 |
| | 12,800 | 12,100 | 0,700 |
| | 56,000 | 49,000 | 7,000 |
| «Pagellus erythrinus» (Pancho) | 0,590 | 0,650 | —0,060 |
| | 5,230 | 2,620 | 2,610 |
| | 8,570 | 5,150 | 3,420 |
| | 13,800 | 9,700 | 4,100 |
| | 18,570 | 14,590 | 3,980 |

Como puede verse, la concordancia de valores es manifiesta para los obtenidos de la pescadilla y la faneca, existiendo desviaciones para los del pancho por causas que justificamos en líneas posteriores.

## MANERA DE OPERAR EN LA COMPARACIÓN DE NUESTRA TECNICA CON LA DE CONWAY

Se toman de uno a dos ejemplares para obtener unos 80 gramos de carne. El pescado, desprovisto mediante un escalpelo de sus aletas dorsales y abdominales, se descabeza y eviscera, y una vez destacada la carne de la espina se corta en pequeños trozos y se machaca en un mortero hasta obtener una pasta homogénea que se pesa. Se toman 10 gramos de pasta de carne para el ensayo colorimétrico y el resto para la técnica de Conway de la manera siguiente: La masa de carne destinada a este ensayo se encierra dentro de un saquito de lona y se dispone sobre la caja de la prensa de tornillo que hemos utilizado para la obtención del jugo de pescado, haciendo diversas expresiones para que la carne ceda toda su trimetilamina. Se reúnen los jugos de las sucesivas extracciones, se agitan con suavidad para homogeneizarlos, se mide el volumen total y con una pipeta se toman para el ensayo 2 c. c. que se vierten en la cavidad circular externa del platillo de Conway. Simultáneamente se introducen en la cavidad central del mismo platillo 1,5 c. c. de Cl H N/70 y se adiciona al jugo de pescado 1 c. c. de solución de formaldehido, neutralizada como se dijo anteriormente, se hace girar el platillo para lograr la mezcla y que se fijen el amoníaco y la dimetilamina, y se agregan finalmente 2 c. c. de la disolución saturada de carbonato potásico, cubriendo el platillo con la tapa de vidrio y moviéndolo ligeramente para mezclar los líquidos.

Como cierre para los platillos de Conway hemos utilizado tapas de vidrio esmerilado cubiertas interiormente de una capa formada por partes iguales de parafina y vaselina filante, que resiste bien la temperatura de incubación.

En otro platillo idéntico se coloca la misma cantidad de ClH N/70, o sean 2 c. c., se cubre con análoga tapa de vidrio y se lleva en unión del anterior a la estufa de calefacción, donde se abandonan a la temperatura de 38° durante cuatro horas, o como hicimos también durante toda la noche, habiéndose obtenido en ambos casos, buenos resultados. Por último, se hace la valoración por retorno mediante NaOHN/70 en presencia de un indicador mezcla de azul de metileno y

rojo de metilo, recomendado por Conway, que vira netamente a un pH 4,5-5,0 de un tono violeta o rosado a verde claro.

Los resultados, como es costumbre en esta clase de determinaciones, los hemos expresado en miligramos de nitrógeno trimetilamínico por 100 gramos de carne, y figuran en la tabla consignada anteriormente, en la que también puede apreciarse la concordancia de los valores obtenidos por nuestro método colorimétrico y por la técnica de Conway en cuanto a la faneca y la pescadilla se refiere; es decir, a dos pescados magros; pero en cuanto a los del pancho hay, sí, un aumento creciente en el contenido trimetilamínico con el transcurso de los días, pero con diferencias apreciables entre las cifras obtenidas por nuestro método y el de Conway, discrepancia de valores debida a la reacción de la lecitina con el reactivo pícrico que se suma a la propia de la trimetilamina, ya que el *Pagellus erythrinus* es un pescado más graso que los otros dos examinados (véase figura 3), habiendo encontrado uno de nosotros (Heras), en análisis de esa especie, efectuados en este Laboratorio un contenido graso de 2,6 grs. por 100, siendo la lecitina de esta grasa la causa perturbadora, que podría eliminarse extrayendo dicha grasa en medio ácido y dejando sólo la sal de trimetilamina, como recomienda Dyer en su citado trabajo.

## OTROS DATOS OBTENIDOS CON EL METODO COLORIMETRICO

*a*) Hemos realizado también unas determinaciones con pescadilla de arrastre, hasta muy avanzado el grado de putrefacción, con objeto de observar el descenso de la cantidad de trimetilamina, por ir disminuyendo, hasta desaparecer el óxido de trimetilamina, a partir del cual se origina.

El primer análisis se verificó sobre la musculatura de los ejemplares recién llegados al Laboratorio. Estos presentaban la carne magullada, pero en buen estado de conservación. La segunda prueba se realizó sobre ejemplares que habían permanecido un día al aire. La tercera, sobre pescadillas mantenidas un día al aire y otro día en agua de hielo. La cuarta, con pescados tenidos un día al aire, otro en agua de hielo y un tercer día al aire. La quinta prueba manteniendo los ejemplares un día al aire, un día en agua de hielo y dos más en seco. Y la sexta determinación con pescadillas dejadas un

día al aire, un día en agua de hielo y tres en seco. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

| Determinación | Nitrógeno trimetilamínico por 100 grs. de carne. |
|---|---|
| 1.ª | 3,570 |
| 2.ª | 9,000 |
| 3.ª | 24,000 |
| 4.ª | 28,570 |
| 5.ª | 40,000 |
| 6.ª | 15,700 |

Estos resultados muestran un aumento constante en el valor del nitrógeno trimetilamínico hasta el valor máximo de 40, para descender cuando la putrefacción está ya muy avanzada. Entonces se produce amoníaco en mayor proporción, así como indol, ácidos volátiles y sulfhídrico en la fase proteolítica (Reay). En la figura 2 hemos representado gráficamente la marcha del contenido trimetilamínico en función del tiempo.

*b*) Durante el pasado mes de agosto se realizaron en este Laboratorio costero ensayos sobre conservación de pescado con el denominado «Hielo-Foromycen», siendo este producto hielo, obtenido de agua, en la que previamente se ha disuelto cierta cantidad de «Foromycen»», producto patentado alemán, que parece ser un polímero del formaldehido, y que, según nuestros informes, ha sido autorizado por los organismos sanitarios alemanes para la conservación de alimentos. Los ensayos efectuados en este Laboratorio, que duraron un mes, comprendieron pruebas organolépticas, incluyendo las degustativas de pescado cocido, siempre en iguales condiciones, y bacteriológicas, ocasión que fué aprovechada por nosotros para comprobar el método colorimétrico de determinación de nitrógeno trimetilamínico, con los resultados siguientes:

PESCADILLA

*Miligramos de nitrógeno trimetilamínico por 100*

| Días transcurridos. | Pescado conservado en hielo corriente | Pescado conservado en hielo «Foromycen» |
|---|---|---|
| 4 | 4,30 | 4,30 |
| 8 | 11,44 | 10,00 |
| 11 | 14,70 | 8,70 |
| 14 | 56,00 | 25,60 |
| 24 | podrido | 80,00 |

Hemos de hacer constar que el pescado se mantuvo, durante los veinticuatro días, completamente cubierto de hielo, reponiéndolo periódicamente según era necesario. También debemos señalar que

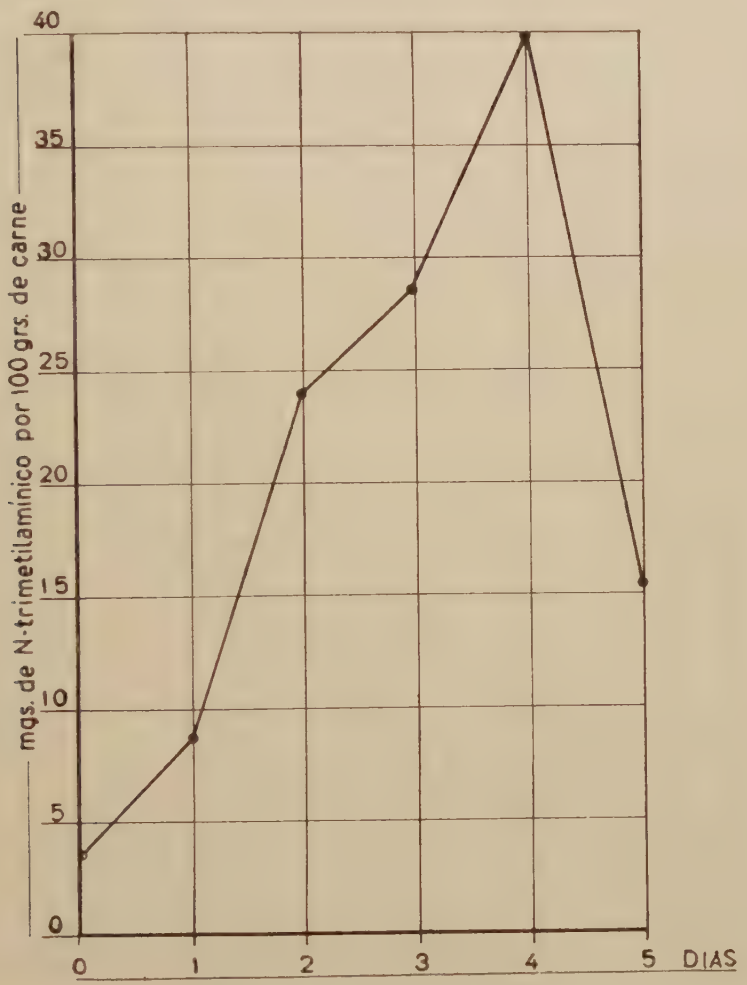


Fig. 2.—Variación del contenido trimetilamínico con el tiempo, en pescadilla de arrastre.

el descenso en contenido trimetilamínico que se observa de la segunda a la tercera determinación para el pescado conservado con hielo «Foromycen» lo atribuímos a las diferencias de tamaño y peso

de los ejemplares de una y otra prueba, siendo el menor el de más elevado contenido trimetilamínico.

## CONSIDERACIONES FINALES

Son tan múltiples y complejos los procesos de la putrefacción, que no se puede especular sobre las excelencias o inconvenientes de

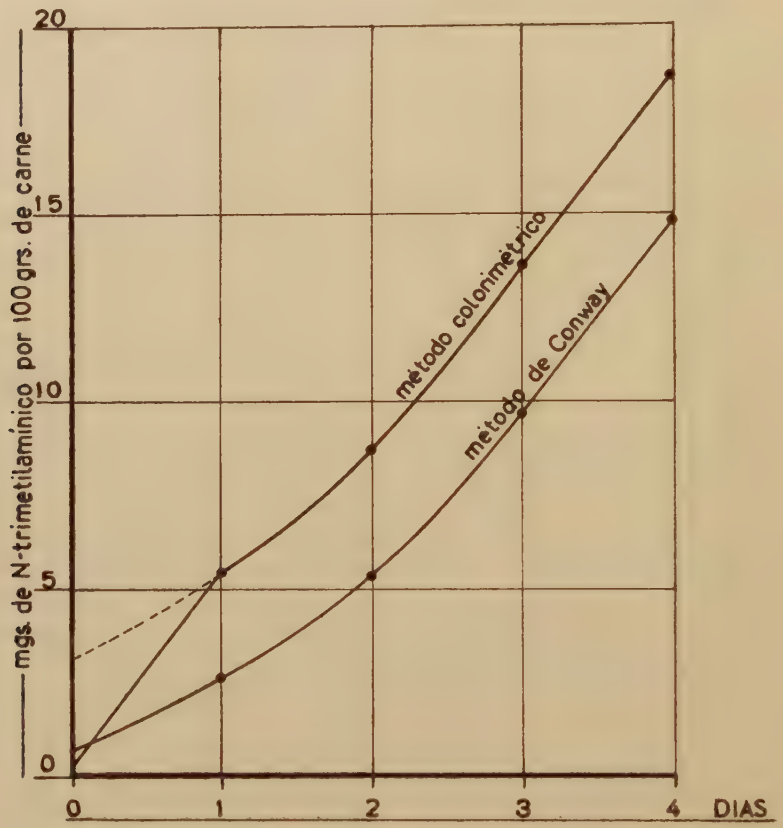


Fig. 3.—Variación del contenido en trimetilamina en la carne muscular del pancho (*Pagellus erythrinus*).

un método sin haberlo comprobado antes con numerosos datos de laboratorio.

Establece Farbe que cada tipo de bacterias da lugar a la presencia de un determinado producto de descomposición predominante so-

bre los demás, y también a productos distintos, según la especie de pescado de que se trate, que se manifiesta incluso por el olor, que es amoniacal para los pescados bentónicos, como el bacalao y el haddock, y ácido para pescados pelágicos, como el atún. Por esto supone que la determinación de una propiedad común a un gran

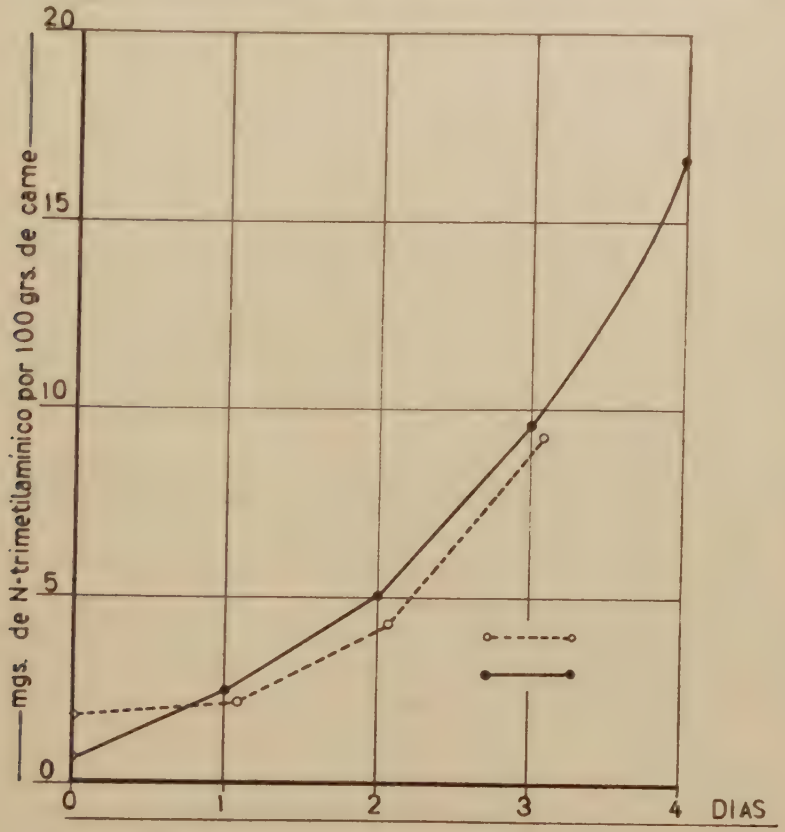


Fig. 4.—Variación comparativa del contenido trimetilamínico en la faneca (*Gadus luscus*) y en el pancho (*Pagellus erythrinus*).

número de sustancias, como el poder reductor, podría dar los mejores resultados. Esta suposición de Farbe sería cierta si fuese idéntico el poder reductor de las sustancias que se producen en la descomposición del pescado, lo que es a todas luces falso, pues es sabido que son bien distintas las cantidades de permanganato potásico que reducen cantidades equivalentes; por ejemplo, de una amina y de

un ácido orgánico, lo que se refleja obligadamente en el valor de su índice, que llama de V. R. S. Así, observando los valores que Farbe consigna en las tablas que dedica a expresar los resultados del poder reductor en función del tiempo, se acusan en casi todas ellas caídas en el valor del poder reductor, para ascender de nuevo, siendo a veces necesario que transcurran muchas horas para que el poder reductor se eleve ligeramente, y sucediendo en otras que después de un buen número de horas ese valor desciende en vez de aumentar, por lo que no hemos considerado este método de las sustancias reductoras volátiles tan aceptable como su autor asegura, aun para las especies por él estudiadas.

Estimamos que la técnica colorimétrica que hemos expuesto es por hoy la más sencilla, rápida y económica para juzgar sobre el grado de frescura del pescado, siendo aplicable, como la hemos descrito, a pescados magros sin error alguno. En pescados grasos, lo que puede ser objeto de ulterior estudio, es necesario extraer previamente en medio ácido para separar la lecitina, que por producir una tonalidad sucia, amarilla intensa, con el ácido pícrico, interfiere la peculiar de la trimetilamina.

A pesar de que los equipos de degustadores de pescado dan indicaciones satisfactorias sobre su estado de conservación, puede ser necesario en casos de duda o litigio, disponer de una prueba objetiva de fácil y rápida realización en laboratorios de escasos medios, como sucede en muchas fábricas, laboratorios de mercados, etc., sirviendo nuestro método colorimétrico a dicho fin, como igualmente contribuir a que pueda legislarse en el sentido de fijar datos analíticos que debe reunir el pescado para su consumo.

*Laboratorio de Vigo del*
*INSTITUTO ESPAÑOL DE OCEANOGRAFIA*

## BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

1. MONTEQUI (R.) : «Control analítico de la alteración del pescado».—Información de Química Analítica.—Sep.-oct. 1947.

2. BOURY (M.) y SCHWINTE (J.) : «Revue de travaux de l'Office des pêches maritimes».—VIII, 3. 1935, pág. 282.

3. FARBE (L.) : «Comparación de los distintos métodos para la determinación de la alteración del pescado». — «Food Technology». 1952, pág. 3/9-25.

4. REAY (G. A.) : «La putrefacción del pescado fresco y su control».—«Chemistry and Industry». 1949, pág. 35.

5. DYER (W. J.) : «Amines in Fish muscle. Colorimetric determination of trimetilamine as the picrate salt».—«Atlantic Fish Experimental Station».—Jan. 8. 1945.

6. GIRAL-ROJHAN : «Productos químicos y farmacéuticos».—Volumen 1.°. Edit. Atlante, S. A.—México D. F. 1946.

7. CONWAY (E. J.) y BYRNE (A). : «An absorption apparatus for the micro-determination of certain volatile substances».—«Biochemical Journal».—1953, 419-29.

# ADVERTENCIAS A NUESTROS COLABORADORES

Los originales que se entreguen para su publicación en este Boletín, deberán prepararse con arreglo a las siguientes normas:

1.ª Deberán escribirse a máquina, a doble espacio y por una sola cara del papel.

2.ª El título expresará de un modo conciso el contenido del mismo.

3.ª Las referencias bibliográficas se harán por llamada al pie de página, indicándose: nombre del autor (en iniciales) y apellidos (en versalitas); denominación de la revista o libro (en cursiva y en forma abreviada); indicación de la serie (entre paréntesis); si se trata de libros, se añadirán editorial, población y año.

4.ª Estos antecedentes bibliográficos se reducirán estrictamente a los que tengan relación inmediata con el trabajo.

5.ª Cuando se haga referencia a algún método general ya establecido por otros autores, se omitirá la descripción de dicho método, citando tan sólo el trabajo original en que figure.

6.ª Los gráficos y esquemas se limitarán en lo posible y deberán dibujarse sobre papel vegetal, con tinta china, teniendo cuidado de que no excedan de dos o tres aumentos sobre las dimensiones lineales de nuestra publicación y de que estén dibujados los trazos, guarismos y letras con energía suficiente para que su lectura sea fácil una vez reducidos al tamaño adecuado.

7.ª Los esquemas y fotografías que deban ser considerados a escala, deberán ir acompañados de una clara especificación de los aumentos del original, con objeto de que, una vez hecha la reducción en el grabado, puedan calcularse con exactitud los nuevos aumentos.

8.ª Las ilustraciones, tanto fotografías como dibujos, deberán hacerse teniendo en cuenta el contenido del punto 6.º de estas advertencias y que han de prestarse, por su claridad, a una reproducción perfecta. En el caso de que algún autor no disponga de elementos adecuados para remitir pruebas fotográficas que llenen tales requisitos, deberá enviarnos los negativos originales, acompañados de una prueba testigo, numerada. Si se trata de microfotografías, pueden remitírsenos las preparaciones para que sean reproducidas en nuestros laboratorios, con indicación en la preparación del campo que interesa fotografiar.

9.ª Los caracteres o tipos a emplear en la impresión deberán determinarse en los originales de la siguiente manera:

*Cursiva*: _____

VERSALITAS: _____

VERSALES: _____

**Negritas**: _____

10.ª Cuando se envíen las pruebas al autor, para su corrección, deberá efectuarse ésta en un plazo no superior a diez días, teniendo en cuenta que cualquier modificación que altere el texto original sólo podrá hacerse previa consulta a nuestra Junta de publicaciones, ya que los originales entregados para su publicación a este Instituto se consideran siempre como definitivamente redactados.

11.ª Aquellos originales que no se ajusten a las normas precedentes podrán ser desechados por la Junta de publicaciones o, en caso de que ésta decida rehacer algunos esquemas o gráficos en forma apta para su reproducción, se cargarán los gastos que se originen al autor del trabajo.

12.ª Los autores acompañarán, en francés o inglés (o simplemente en castellano), un resumen de su trabajo, que no excederá de una extensión de 10 líneas de nuestro Boletín.

45.—Angeles ALVARIÑO: «Incrustaciones marinas».

46.—J. ARAVIO-TORRE y A. ARÉVALO: «Estudio de los wolframatos como agentes inhibidores de la corrosión».

47.—R. MARGALEF: «Estudio sumario del fitoplancton de la Ría de Vigo (1948-1950)».

48.—M. OLIVER y M. MASSUTÍ: «El raó, *Xyrichthys novacula* (Fam. *Labridae*). Notas biológicas y biométricas».

49.—F. LOZANO CABO: «Nota preliminar sobre la biometría, biología y anatomía general del *Notacanthus bonapartei* Risso».

50.—E. SECO SERRANO: «Velocidad vertical de propagación del sonido en el Mar de Alborán. Aplicación a la corrección de eco-sondas».

51.—G. COLOM: «Foraminíferos de las costas de Galicia (Campañas del *Xauen* en 1949 y 1950)».

52.—Joaquín GÓMEZ DE LLARENA: «Observaciones sobre los sedimentos de las costas de Galicia (Campañas del «Xauen» en 1949 y 1950), con un Apéndice de Josefina PÉREZ MATEOS, sobre «Análisis mineralógico de algunas muestras».

53.—A. RODRÍGUEZ DE LAS HERAS y M. C. MÉNDEZ ISLA: «Contribución a los estudios químicos sobre pescados españoles».

54.—José M.ª NAVAZ y F. de P. NAVARRO: «Nuevas observaciones sobre la sardina del Golfo de Vizcaya (1951) y consideraciones sobre la estadística de pesca».

55.—R. FERNÁNDEZ y F. DE P. NAVARRO: «La sardina de Santander. Observaciones en 1950 y 1951».

56.—M. OLIVER y F. DE P. NAVARRO: «Nuevos datos sobre la sardina de Vigo (febrero de 1950 a marzo de 1952)».

57.—Emma BARDÁN y F. DE P. NAVARRO: «Estudios sobre la sardina de Málaga en 1951 y consideraciones sobre la variabilidad de su fórmula vertebral»

58.—M. OLIVER y F. NAVARRO: «La alacha y la sardina de Baleares. Investigaciones en 1950 y 1951».

59.—F. LOZANO: «Monografía de los Centracántidos mediterráneos, con un estudio especial de la biología, biometría y anatomía de *Spicara smaris* (L.)»

60.—E. JIMENO y A. ARÉVALO: «Acción inhibidora del ácido pirogálico en la corrosión del hierro por el agua del mar».

61.—P. BALLE: «Fitoplancton de la bahía de Palma de Mallorca (Año 1952)».

62.—B. ANDREU: «Sobre la relación entre el número de branquispinas y la talla en la sardina española (*Sardina pilchardus* Walb.)».

63.—M. CLIVER: «Bionomia de los fondos de 300 a 600 mts. en el Sur y Suroeste de Mallorca...».

64.—F. LOZANO CABO: «Notas sobre una Campaña de prospección pesquera en la Mar Chica de Melilla».

NOTA.—Pedidos y correspondencia al Sr. Secretario del INSTITUTO ESPAÑOL DE OCEANOGRAFÍA, Alcalá, 27. Madrid.

Imp. F. Domenech, S. A. - Tel. 31 46 85